

明細書

20050720 Rec'd PCT/PTO 14 JUL 2006

動脈硬化の予防・治療用医薬

技術分野

- 5 本発明は、動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化の診断薬、動脈硬化の診断マーカーなどに関する。

背景技術

- 死亡原因の最上位を占める虚血性心疾患や脳血管障害などの虚血性臓器疾患発症の原因として粥状動脈硬化の存在は重要である。動脈硬化病変の病理形態学的特徴は、内皮下にコレステロールエステルを蓄積した主にマクロファージからなる細胞（泡沫化細胞）が集積した脂肪線条（fatty streak）、さらに進行した状態である、平滑筋細胞、マクロファージ、T細胞などの浸潤と細胞壊死像と脂質蓄積が認められる繊維性硬斑（fibrous plaque）である。脂質蓄積した部位は構造的脆弱性を示し、血行力学的な力が引き金となり硬斑が破綻し（plaque
- 15 rupture）、組織因子と血液凝固系因子との反応により急激に血栓が形成する。冠動脈で硬斑が破綻し血栓性閉塞が起きることが急性心筋梗塞、不安定狭心症、心臓性突然死などのいわゆる急性冠症候群（acute coronary syndrome）の発症に密接に関係する事が明らかにされてきている（Fuster, V. et al., N. Engl. J. Med., 326, 242-250, 1992）。
- 20 急性冠症候群発症の最も重要な危険因子は、いくつかの大規模疫学的調査（4S study, CARE studyなど）により、血清コレステロール値、特に低密度リポタンパク質-コレステロール値（LDL-C）であることが示されており、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチン系薬剤による血清コレステロール低下療法が心疾患イベントの発症率を低下させたエビデンスは危険因子としてのLDLの妥当性を証明
- 25 するものである。

細胞生物学的検討から、マクロファージ細胞は、スカベンジャー受容体ファミリーと呼ばれる受容体により、血中の主要脂質担体であるLDLが修飾を受けた酸化LDLを細胞内に取り込むことが明らかとなった。この受容体は細胞内コレステロール量によるネガティブフィードバックを受けず、マクロファージはこの

受容体を介して過剰の酸化LDLを取り込んで泡沫化細胞となる。

高コレステロール血症患者では高LDL血症を示し、またLDLの易酸化性等が報告されている点、近年、酸化LDLの特異的抗体を用いた血中酸化LDLの定量系開発が行われ、心疾患のリスクが高い患者群での血中濃度が上昇し、さらに病変部位での酸化LDL陽性マクロファージ細胞数が増加しており (Ehara, S. et al., *Circulation*, 103, 1955-1960, 2001)、酸化LDLによるマクロファージの泡沫化を機序とした粥状動脈硬化病変形成が生体レベルで起きていることが強く示唆されてきた。酸化LDLはマクロファージ細胞を泡沫化させるだけではなく、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ細胞に対して、動脈硬化惹起性の作用を示すが、その1つとしてアポトーシスの誘導が考えられる。本発明者らはこの泡沫化マクロファージのアポトーシスに関して、セラミドの代謝系に関わる酵素が重要な役割を演じており、動脈硬化形成に関与していることを報告している (WO 03/78624号公報)。

一方、疎水基としてセラミドを持つスフィンゴ糖脂質の動脈硬化巣での蓄積も報告され (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 15, 1607-1615, 1995)、その中でもGM3は、WHHLウサギではノーマルウサギと比べて蓄積が11倍上昇し (Hara, A. and Taketomi, T., *J. Biochem.* 109, 904-908, 1991)、ヒト大動脈の病巣では抗GM3抗体陽性細胞が蓄積していることなどが明らかとなっている (Bobryshev, Y. V., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1535, 87-99, 2001)。さらに、GM3は、マクロファージによるLDLの取込みを加速させるという報告もある (Prokazova N et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 177, 582-587, 1991)。しかしながら、これらGM3の蓄積メカニズム、さらには、その蓄積が動脈硬化形成に関与しているのかについては、現在、全く分かっていない。

生体内でGM3を生成する経路に関しては、主に二種類の経路が知られている。一つは、ラクトシルセラミドにN-アセチルノイラミン酸を付加してGM3を合成する経路で、これはGM3合成酵素により触媒される (Kolter, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 25859-25862, 2002)。もう一つの経路は、GM2からN-アセチルガラクトサミンを除去してGM3を生成する経路で、この反応は、 β -ヘキソサミニダーゼが触媒する (Tettamanti, G. et al., *Biochimie*, 85, 423-437, 2003)。

また、GM3はTNF α 刺激により脂肪細胞で増加し、インスリン抵抗性の原因物質となる可能性が報告されている (Tagami, S. et al., J. Biol. Chem., 277, 3085-3092, 2002)。GM3合成酵素を3T3-L1脂肪細胞で過剰発現させると、インスリンレセプターの自己リン酸化は変化しないが、IRS-1のリン酸化が選択的に抑制されることや、脂肪細胞にGM3を添加するとインスリン刺激によるIRS-1のリン酸化やグルコースの取り込みの抑制が起こることから、GM3そのものがインスリン抵抗性を惹起する可能性が指摘されている。

また、Zucker fa/faラット、ob/obマウスなど、脂肪組織でTNF α を過剰発現する動物のGM3合成酵素のmRNAは、それぞれの対象である痩せ型動物と比較して著しく高い。これらの結果から、脂肪細胞ではTNF α シグナルで細胞内のGM3が増加し、インスリンレセプターのインターナリゼーションが抑制されインスリン抵抗性が出現したと推定されている。

GM3合成酵素はType-II membrane proteinでN末端に膜貫通領域を持ち、ゴルジ内腔側に存在する膜タンパク質である。その発現は脳や骨格筋、精巣などで高いとされているが (Ishii, A. et al., J. Biol. Chem., 273, 31652-31655, 1998)、GM3合成酵素欠損マウスは、成獣にまで生育する成績から (Yamashita, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 3445-3449, 2003)、GM3合成酵素の活性がマウスの生育に必須ではないことを示している。この欠損マウスのインスリンに対する感受性は高く、高脂肪食負荷のインスリン抵抗性に対して防御的に働くことから、GM3は、インスリンシグナルの負の制御因子と考えることもできる。

発明の開示

動脈硬化発症モデル動物で特異的に発現変動する分子を標的とし、有用な診断マーカーを確立すること、動脈硬化における血漿中のタンパクの動態を明らかにすること、更には、従来知られている動脈硬化の危険因子の制御とは異なるメカニズムで動脈硬化の予防・治療効果を示す優れた薬剤を提供することが切望されている。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意努力した結果、GM3合成酵素

が動脈硬化惹起性刺激で発現誘導され、動脈硬化促進活性があることを見出した。即ち、動脈硬化発症モデル動物であるApoEノックアウトマウスの大動脈サンプルで発現が亢進している遺伝子群のなかから、シグナル伝達系あるいは代謝系全体の変化を調べるためにパスイュー解析を行い、glycosphingolipid (GSL) 代謝

5 の亢進を見出した。そのなかでヒトやウサギの動脈硬化病巣での蓄積が報告されているGM3の合成酵素が、マクロファージ細胞において動脈硬化惹起性刺激で発現亢進が顕著であることを見出した。動脈硬化巣に存在するマクロファージではINF- γ をはじめとする動脈硬化惹起性刺激によって細胞内のGM3が増加し、コレステロール搬出能の低下や炎症性反応、MMP産生能などの誘導が起こり、動脈硬

10 化促進的に作用していると考えられる。このGM3合成酵素の動脈硬化促進作用を明らかにし、その作用を有効に阻害することにより、動脈硬化の新たな予防法および／または治療法を確立することができる。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、GM3合成酵素を阻害する薬剤が、インスリン抵抗性の改善薬に加えて、動脈硬化予防および／または治療薬となる

15 可能性も考え、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) GM3合成酵素阻害剤を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬；
- (2) GM3合成酵素遺伝子の発現阻害剤を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬；
- 20 (3) GM3合成酵素が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記(1)または(2)記載の医薬；
- (4) GM3合成酵素が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩である前記(1)または(2)記載の医薬；
- 25 (5) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド；
- (6) 前記(5)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬；

- (7) 動脈硬化の予防・治療用医薬である前記(6)記載の医薬；
- (8) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する s i RNA または s h RNA ；
- 5 (9) 前記(8)記載の s i RNA または s h RNA を含有してなる医薬；
- (10) 動脈硬化の予防・治療用医薬である前記(9)記載の医薬；
- (11) GM3合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬；
- (11a) 抗体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体である前記(11)記載の医薬；
- 10 (12) GM3合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の診断薬；
- (12a) 抗体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体である前記(12)記載の診断薬；
- 15 (13) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる動脈硬化の診断薬；
- (14) GM3合成酵素に対する抗体または配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする動脈硬化の診断方法；
- 20 (15) 動脈硬化の診断薬の製造のためのGM3合成酵素に対する抗体または配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用；
- 25 (16) 哺乳動物の血漿中のGM3量を測定することを特徴とする動脈硬化の診断方法；
- (17) GM3の動脈硬化の診断マーカーとしての使用；

- (18) 哺乳動物の血漿中のGM3合成酵素の量を測定することを特徴とする動脈硬化の診断方法；
- (18a) 哺乳動物の血漿中の可溶化GM3合成酵素の量を測定することを特徴とする動脈硬化の診断方法；
- 5 (19) GM3合成酵素の動脈硬化の診断マーカーとしての使用；
- (19a) 可溶化GM3合成酵素の動脈硬化の診断マーカーとしての使用；
- (20) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法；
- 10 (21) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング用キット；
- (22) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法；
- 15 (23) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング用キット；
- 20 (24) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法；
- (25) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の量を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法；
- 25 (26) GM3合成酵素に対する抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量方法；

(27) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの量を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法；

- 5 (28) GM3 合成酵素を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

(28a) GM3 合成酵素の活性を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

- 10 (28b) GM3 合成酵素の発現または産生を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

(29) GM3 合成酵素遺伝子の発現を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

(30) GM3 合成酵素阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

- 15 (31) GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法；

(32) 動脈硬化の予防・治療剤の製造のための GM3 合成酵素阻害剤の使用；

(33) 動脈硬化の予防・治療剤の製造のための GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤の使用などを提供する。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる GM3 合成酵素 (Ganglioside GM3 synthase ; EC 2.4.99.9) は、S I A T 9 (sialyltransferase 9) 、S A T - I (sialyltransferase I) 、CMP-シアル酸:ラクトシルセラミド α -2,3シアル酸転移酵素 (CMP-NeuAc:lactosylceramide α -2,3-sialyltransferase) などとも呼ばれ、CMP-シアル酸 (CMP-N-acetylneuraminate) 由来のシアル酸を β -D-galactosyl-1,4- β -D-glucosylceramide の非還元末端ガラクトースに α -2,3結合で転移することで生合成される GM3 (α -N-acetylneuraminy-2,3- β -D-galactosyl-1,4- β -D-glucosylceramide) の合成反応を触媒する酵素である。

本発明で用いられるGM3合成酵素としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列(NP_003887)と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある)などが挙げられ、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と

実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有する
5 タンパク質などが挙げられるが、配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質が好ましく用いられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、GM3の合成反応を触媒する酵素活性（GM3合成酵素活性）などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理的に）同質であることを示す。したが
10 って、GM3合成酵素活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

GM3合成酵素活性の測定は、自体公知の方法、例えば、ラクトシルセラミドを基質として、CMP-シアル酸（10-100 nmol）と酵素を、一定時間、37℃でイン
15 キュベートし、酵素反応によって生成したGM3を定量する方法（例、Methods in Enzymology, 311巻, 82-94 (2000)などに記載の方法など）またはそれに準じる方法などにより測定することができる。

また、例えば、細胞表層あるいは細胞内GM3量などでも測定できる。

具体的には、GM3合成酵素発現細胞株（例えばマウスメラノーマB16-F
20 1株など）における細胞表層、あるいは細胞内GM3を抗GM3抗体を用いて量的に検出する方法が知られている。細胞表層GM3はホルムアルデヒドなどで固定化した後、抗GM3抗体（例えばClone M2590など）と反応させた後、HRP標識抗マウスIgM抗体あるいはAP標識抗マウスIgM抗体と反応させ、化学発光系あるいは発色系で検出する方法が知られている（Wang, X. Q. et al., J.
25 Biol. Chem., 277, 47028-47034, 2002）。また、ホルムアルデヒドなどで固定化したあるいは非固定の浮遊した状態の細胞と抗GM3抗体（例えばClone M2590など）とを反応した後、FITC標識抗マウスIgM抗体などと反応後、FACSで解析する方法が知られている（Tagami, S. et al., J. Biol. Chem., 277, 3085-3092, 2002）。また、細胞内GM3量は細胞をTriton X-100な

どで溶解させることで検出可能となる (Inokuchi, J. et al., J. Cell Phys., 141, 573-583, 1989)。

本明細書において、「GM3 合成酵素阻害」とは、GM3 合成酵素の活性の阻害またはGM3 合成酵素の産生の阻害（好ましくは、GM3 合成酵素の活性の阻害）の何れであってもよい。

また、本明細書において、「GM3 合成酵素阻害剤」とは、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩；配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の産生を阻害する化合物またはその塩（好ましくは、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩）の何れであってもよい。本明細書において、「GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤」としては、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する化合物またはその塩などが用いられる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、1) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、2) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、3) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、4) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され

たアミノ酸配列、または5) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

- 5 本発明で用いられるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。
- 10 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。
- 15 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。
- 20 さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。
- 25

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表

されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

- 5 具体的には、後述する本発明の抗体を調製する目的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

- 10 また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 20 また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

- 25 さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、
5 あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。
10

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。
15

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、
20 ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げる
25

このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。

反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種

保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロア

セチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素な

- どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。
- 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。
- タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

- 5 本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分と
- 10 を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の1)～5)に記載された方法が挙げられる。

- 1) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- 15 2) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- 3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- 4) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- 20 5) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

- また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩
- 25 に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲ

ノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より
5 totalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2 (NM_003896) など表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2
10 などで表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2などで表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば配列番号：2などで表される塩基配列
15 と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for
20 Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab.
25 Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40m

M、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質
5 をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲ
10 ノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2などで表される塩基配列を含有するDNAの一部を有するDNA、または配列番号：2などで表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性
15 を有するタンパク質をコードするDNAの一部を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2などで表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

20 ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段として、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部を有する合成DNA
25 プライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、

Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (タカラバイオ (株))、MutanTM-K (タカラバイオ (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウィルス、ワクシニアウィルス、バキュロウィルスなどの動物ウィルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMV (サイトメガロウィルス) プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp

プロモーター、*lac*プロモーター、*recA*プロモーター、 λ P_Lプロモーター、*lpp*プロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、*penP*プロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*dhfr*と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、*dhfr*遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて*dhfr*遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60

巻, 160 (1968)〕, J M 1 0 3 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309 (1981)〕, J A 2 2 1 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978)〕, H B 1 0 1 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459 (1969)〕, C 6 0 0 [Genetics, 39巻, 440 (1954)〕などが用いられる。

- 5 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255 (1983)〕, 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984)〕などが用いられる。

- 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R⁻, N A 8 7 - 1 1 A, D K D - 5 D, 2 0
10 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3, N C Y C 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。

- 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中
15 腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five™ 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In
20 Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

- 動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7, V e r o, チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r⁻) 細胞と略記), マウス L 細胞, マウス A t T - 2 0, マウスミエローマ細胞, マウス A T D C 5 細胞,
25 ラット G H 3, ヒト F L 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110 (1972) や Gene, 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうこ

とができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

5 酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機
20 物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-
25 433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 5 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 10 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [Science, 122巻, 501 (1952)]、DME M培地 [Virology, 8巻, 396 (1959)]、RPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association-199巻, 519 (1967)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 25 本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-1

0.01%などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）

に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 5 本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
- 10

- モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。
- 15
- 20

- 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。
- 25

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固

相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製

造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

5 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

10 また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全
15 フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。
20

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、
25 または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチ

ドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、（ロ）RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2などで表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなど、好ましくは例えば、配列番号：2などで表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2などで表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするもので

あればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということが出来る。アンチセンスポリリボヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊

な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定

されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 10 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を
- 15 高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、-コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付
- 20 着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、そ
- 25 れに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発

明のタンパク質と略記する場合がある)、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド(以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある)の用途を説明する。

本発明のタンパク質は、動脈硬化性疾患において、また、動脈硬化病変部で発現が増加するので、動脈硬化の診断マーカーとして利用することが出来る。すなわち、本発明のタンパク質(好ましくは、可溶化タンパク質(1回膜貫通型の膜タンパク質である本発明のタンパク質を可溶化したタンパク質)など)は、動脈硬化性疾患における早期診断、動脈硬化の進展度の推定のためのマーカーとして有用である。よって本発明のタンパク質をコードする遺伝子のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質をコードする遺伝子に対するsiRNAまたはshRNA、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬などは、例えば、動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤などとして使用することができる。

また、本発明のタンパク質により合成されるGM3は、動脈硬化性疾患において、また、動脈硬化病変部で量が増加するので、動脈硬化の診断マーカーとして利用することが出来る。すなわち、動脈硬化性疾患における早期診断、動脈硬化の進展度の推定のためのマーカーとして有用である。

(1) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は動脈硬化病変部で発現が増加しており、さらに、本発明のタンパク質を阻害する〔以下、「本発明のタンパク質の活性を阻害すること」、「本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害すること」および「本発明のタンパク質の産生を阻害すること」を総称して、「本発明のタンパク質を阻害する」と記載することがある。また、本発明のタンパク質を阻害する化合物またはその塩自体を、本発明のタンパク質の阻害剤と称することがある。さらに、本発明の動

脈硬化の予防・治療用医薬には、本発明のタンパク質を阻害する化合物またはその塩自体およびこれを含有する医薬組成物などが含まれる。〕と動脈硬化の病変が改善される。従って、本発明のタンパク質を阻害する化合物またはその塩は、例えば、動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として使用することができる。また、例えば、糖尿病などへの適応も考えられる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、かつそのスクリーニング方法を提供する。

- より具体的には、例えば、
- (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞、その細胞抽出物あるいはその精製タンパクのGM3合成酵素活性と、
 - (ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞、その細胞抽出物あるいはその精製タンパクと試験化合物の混合物のGM3合成酵素活性とを比較することを特徴する本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法；
 - (iii) 本発明のタンパク質の脂質蓄積促進活性と、(iv) 本発明のタンパク質と試験化合物の混合物の脂質蓄積促進活性とを比較することを特徴とする本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法などが用いられる。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞内あるいは細胞外に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられる。

例えば、上記 (ii) の場合における GM 3 合成酵素活性を、上記 (i) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として選択することができる。

- 5 また、例えば、上記 (iii) の場合における脂質蓄積亢進活性を、上記 (iv) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として選択することができる。

- 10 本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を阻害するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質の遺伝子も、動脈硬化において発現が増加するので、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩も、例えば動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

- 20 したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

- 25 スクリーニング方法としては、(v) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(vi) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、(v) と (vi) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするポリヌクレオチド（例、mRNA など）の量を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、

5 ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2などまたはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2などまたはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

10 例えば、上記(v)の場合における遺伝子の発現を、上記(vi)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは
15 部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、
20 抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、GM3合成酵素活性など）を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物またはその塩である。

25 該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物またはその塩などはそれぞれ、例えば動脈硬化の予防・治療用医

薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 5 例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

- 15 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol)
- 20 adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では 5～10

0 mg、その他の剤形では10～250 mgの上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、動脈硬化性疾患（例、心筋梗塞、不安定狭心症など）の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場
15 合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、動脈硬化性疾患（例、心筋梗塞、不安定狭心症など）の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より
20 好ましくは約0.1～10 mg程度を動脈硬化病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（2）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

- 25 本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合

的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

- (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法などを提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

- 10 また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。
- 15 本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イム
- 20 ノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素
- 25 としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用い

られる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体と

して固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質

を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば動脈硬化性疾患などに罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用

(3) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874～879頁(1989年)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 第86巻, 2766～2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現増加が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば動脈硬化性疾患である可能性が高いと診断することができる。

(4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、医薬とし

て使用することができる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを医薬として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクター、レンチウイルスベクター、リポソーム誘導体などの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、
5
あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。
10

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポソームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。
15

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、治療目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。
20

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA（本発明のポリヌクレオチドに対するsiRNA（small（short）interfering RNA）、shRNA（small（short）hairpin RNA）など）、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑
25

制することができるので、医薬として使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

- 5 リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。
- 10 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを医薬として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

（5）本発明の抗体を含有する医薬

- 本発明の抗体は、医薬として使用することができる。また、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分
- 15 を用いてもよい。

- 本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与することができる。好ましくはワクチンとして定法に従って投与することができる。
- 20

- 本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体およびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。
- 25

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通

常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、
5 ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。この
15 ような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形
20 としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常 5～500mg 程度、とりわけ注射剤では 5～100mg 程度、その他の剤形では 10～250mg 程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

本発明の抗体を含有する医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を 1 回量として、通常 0.01～20mg/kg 体重程度、
25 好ましくは 0.1～10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.1～5mg/kg 体重程度を、1 日 1～5 回程度、好ましくは 1 日 1～3 回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに

準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

5 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

10 (6) 本発明の「本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩」；「本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩」および「本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物またはその塩」について

「本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩」および「本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物またはその塩」は、例えば動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として用いられる。

「本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩」は、例えば動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として用いられる。また、本明細書における動脈硬化の予防・治療用医薬、動脈硬化性疾患の予防・治療剤には、「本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩」自体；「本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩」自体；「本発明のタンパク質の産生を阻害する化合物またはその塩」自体；およびこれらのいずれかを含有する医薬組成物などが含まれる。

該予防・治療剤は、上記と同様にして製造される。

(7) DNA転移動物

25 本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において
発現しうる組換えベクターを提供するものである。

- 5 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、
本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始
原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生におけ
る胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般
に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、
10 凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキス
トラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することがで
きる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目
的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用するこ
ともでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により
15 融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

- 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、
ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、
病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、ま
た、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57B
20 L/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、
B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、
Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、
上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

- 25 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA
ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、
突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置
換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、1) ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、2) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンI I、ウロプラキンI I、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK 1, K 10およびK 14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリ

ウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にT i e 2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（N a, K-A T P a s e）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびI I A、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2 L）、H-r a s、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（T P O）、
5 ペプチド鎖延長因子1α（E F-1 α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、T h y-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（V N P）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、
10 バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1α（E F-1 α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーR N Aの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのS V 4 0ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスブライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変

異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

- 5 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は
- 10 その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

- 15 受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。
- 20 導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

- 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発
- 25 明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の

タンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば動脈硬化性疾患などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行うことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例

えば、

- 1) 組織培養のための細胞源としての使用、
- 2) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- 3) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 4) 上記3) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- 5) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 5 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 10 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- 15 (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

25 非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することに

より本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

- 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

- また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバックク

ロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-1000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行うが、こ

の際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

- E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの
- 5 種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のE S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。
- 10

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。
- 15

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の
- 20 本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

- 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用した
- 25 マウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚ま

たは胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

5 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、
10 本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に
15 変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、
20 該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテ
25 ロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の

不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 10

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。
- 15

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。
- 20

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 25 例えば動脈硬化性疾患などに対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA転移非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と動脈硬化性疾患の発症度合いの違いや動脈硬化性疾患の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試

験動物の上記疾患症状が約 10 % 以上、好ましくは約 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の発現亢進などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。本発明のタンパク質の発現亢進などによって引き起こされる疾患としては、例えば、動脈硬化性疾患などが挙げられる。従って、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の産生を妨害する化合物またはその塩などは、動脈硬化性疾患などの疾患の予防・治療剤として使用することができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質の抗体を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 6

0 k gとして)の動脈硬化性疾患患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人

- 5 (60 k gとして)の動脈硬化性疾患患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 k gあたりに換算した量を投与することができる。

10 (8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 15 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

- 20 試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 25 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタ

ンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を調節（促進または阻害；好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の調節（促進または阻害；好ましくは阻害）、該タンパク質の機能を調節（促進または阻害；好ましくは阻害）することができるので、例えば動脈硬化性疾患などの予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記

した本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を調節（促進または阻害；好ましくは阻害）する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の動脈硬化性疾患患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を調節（促進または阻害；好ましくは阻害）する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の動脈硬化性疾患患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用

できる。

(9) 本発明のタンパク質または本発明のDNAを含有してなる医薬

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合
5 合には、これらに起因する疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、前記疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ) 本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタン
10 パク質を発現させることによって、(ロ) 細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ) 本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

15 本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体と
20 ともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

25 本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般

に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、

ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のタンパク質を経口投与する場合、一般的に成人
5 （体重60kgとして）においては、一日につき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のタンパク質を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約0.0
10 1～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関
15 し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
20 T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
25 dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸

- | | | |
|----|----------------------------------------|-----------------------------|
| | EDTA | : エチレンジアミン四酢酸 |
| | SDS | : ドデシル硫酸ナトリウム |
| | Gly | : グリシン |
| | Ala | : アラニン |
| 5 | Val | : バリン |
| | Leu | : ロイシン |
| | Ile | : イソロイシン |
| | Ser | : セリン |
| | Thr | : スレオニン |
| 10 | Cys | : システイン |
| | Met | : メチオニン |
| | Glu | : グルタミン酸 |
| | Asp | : アスパラギン酸 |
| | Lys | : リジン |
| 15 | Arg | : アルギニン |
| | His | : ヒスチジン |
| | Phe | : フェニルアラニン |
| | Tyr | : チロシン |
| | Trp | : トリプトファン |
| 20 | Pro | : プロリン |
| | Asn | : アスパラギン |
| | Gln | : グルタミン |
| | pGlu | : ピログルタミン酸 |
| | Sec | : セレノシステイン (selenocysteine) |
| 25 | また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。 | |
| | Me | : メチル基 |
| | Et | : エチル基 |
| | Bu | : ブチル基 |

	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
5	Bzl	: ベンジル
	Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
10	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Trt	: トリチル
	Bum	: t-ブトキシメチル
15	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
20	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

GM3合成酵素のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

- 25 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するGM3合成酵素をコードするDNAの塩基配列を示す。(GenBank: NM_003896に記載の塩基配列の278番目~1363番目の塩基配列に相当する。)

〔配列番号：3〕

実施例1で用いられたセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

実施例1で用いられたアンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

実施例5で用いられたshRNA用塩基配列を示す。

5 〔配列番号：6〕

実施例5で用いられたshRNA用塩基配列を示す。

実施例

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれら
10 に限定されるものではない。

実施例1

ウサギ大動脈の動脈硬化病巣でのGM3合成酵素発現検討

5週齢ニュージーランド白色家兎（Kbl:NZW）を0.5%コレステロール添加RC-4
15 飼料で8週間飼育後、さらに4週間RC-4飼料で飼育した。麻酔下、頸動脈から放血
した後、大動脈起始部から胸部大動脈までのサンプリングを行った。冷却生理食
塩水中で血管から脂肪組織、結合組織などのトリミングを行い、冷却RNAlater
（QIAGEN社製）中で保存した。大動脈を目視により動脈硬化病変が多い部分と少
ない部分とに二分割し、RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit（QIAGEN社製）を用
20 いてトータルRNAを調製した。TaqMan Reverse Transcription Reagents
（Applied Biosystems社製）を用いてcDNAを作成した。TaqMan Universal PCR
Master Mix（Applied Biosystems社製）を用いてPCR反応を行い、アガロースゲル
電気泳導を行い半定量的に発現量を比較検討した。PCRプライマーはウサギGM3合
成酵素の部分配列を取得し、その塩基配列情報からデザインした。センスプライ
25 マーはTAATCGGAAGTGGCGGAATAC（配列番号：3）、アンチセンスプライマーは
CTCGGCCCCAGAACCTTGACC（配列番号：4）を用いて、アニーリング温度55℃、サ
イクル数34回の条件でPCR反応を行った。アガロースゲル電気泳導の結果、同一
個体での比較から、明らかに動脈硬化病変が少ない血管部分に比較して、病変が
多い血管部分でGM3合成酵素のmRNA発現が亢進していることが示された。従って、

動脈硬化病巣ではGM3合成酵素活性が上昇することが示唆された。

実施例 2

マウス腹腔マクロファージ細胞におけるインターフェロン γ 刺激でのGM3合成酵素発現への影響

- 5 梶田らの方法（実験医学別冊 vol. 14、No. 12、循環研究プロトコール、pp. 49-52（1996））に従い、チオグリコレート刺激後のC57BL/6jマウスより腹腔マクロファージを調製した。10%FBS-DMEM培地に $1.5-2 \times 10^6$ 細胞/mLとなるように懸濁し、12ウェルプレートに1mL/ウェルで播種した。37℃、5% CO₂下で一晩
- 10 培養後、PBSで洗浄し、所定濃度マウスリコンビナントIFN- γ 含有1%FBS-DMEM培地を添加し、24時間培養した。

- PBSで一回洗浄後、RNeasy Mini Kit（QIAGEN社製）を用いてトータルRNAを調製し、TaqMan Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems社製）を用いてcDNAを作成した。TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems
- 15 社製）を用いてTaqMan PCR法で発現量の定量を行った。マウスGM3合成酵素のTaqMan プローブ、プライマーはApplied Biosystems社が提供する、Assays-on-Demand（Mm00488232_m1）を用いた。

定量は内部標準としてGAPDH発現量を用いて、 $\Delta\Delta Ct$ 法によりIFN- γ 未処理の条件を1として相対値として求めた。結果を表1に示す。

20

（表 1）

	mIFN- γ (U/mL)	発現量
	0	1
25	1	4
	10	25

マウスGM3合成酵素の発現量は、動脈硬化惹起性サイトカインとして知られているIFN- γ 処理で用量依存的に上昇することが示された。この結果から、動脈硬

化病巣でGM3合成酵素が発現上昇するのはIFN- γ による可能性が示された。

実施例 3

THP-1細胞におけるヒトGM3合成酵素の発現量に対するインターフェロン γ の影響

- 5 24ウェルプレート（ファルコン社）に1ウェル当たり 1.0×10^6 個に懸濁した
THP-1細胞を、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート（最終濃度：100
nM）を含むRPMI-1640培地（10% FBS, 25 mM HEPES, ペニシリン/ストレプ
トマイシンを含む）で3日間処理しマクロファージ様に分化させた。PBSで洗浄
10 後、所定濃度のヒトリコンビナントIFN- γ 含有RPMI-1640培地を添加し、24時間
培養した。

PBSで一回洗浄後、実施例 2 と同様の方法でヒトGM3合成酵素の発現量を定量し
た。ヒトGM3合成酵素のTaqMan プローブ、プライマーはApplied Biosystems社が
提供するAssays-on-Demand（Hs00187405_m1）を用いた。

- 15 定量は内部標準としてGAPDH発現量を用いて、 $\Delta\Delta Ct$ 法によりIFN- γ 未処理の
条件を1として相対値として求めた。結果を表 2 に示す。

（表 2）

	hIFN- γ (ng/mL)	発現量
20	0	1
	3	1.9
	10	2.6
	30	2.4

- 25 この結果、ヒトGM3合成酵素の発現量が、インターフェロン γ の処理濃度に依
存して亢進することが明らかとなった。

実施例 4

1) GM3合成酵素阻害剤のスクリーニング方法 (1)

RAW264.7株(ATCCから購入; Raschke WC, et al., Cell, 15巻, 261-267頁, 1978年)に、レトロウィルスによりヒトGM3合成酵素遺伝子を導入して樹立したヒトGM3合成酵素安定発現細胞株を、10% FBS含有DMEM培地で培養した。コンフルエントになるまで培養した後、冷却したPBSで一度洗浄後、細胞を回収した。

- 5 細胞の湿重量を測定し、その3倍容量の細胞懸濁緩衝液(15mM sodium cacodylate (pH6.5), 5% glycerol)で細胞を懸濁した。超音波処理により細胞を破碎し、細胞残渣を遠心分離により除いた上清を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク濃度はBCA(バイオラッド)を用いて測定した。

- 10 BODIPY-ラクトシルセラミド(モレキュラプローブ社)のクロロホルム溶液をエッペンドルフチューブに入れて窒素気流下で乾固させた。4倍反応緩衝液(400mM sodium cacodylate (pH6.5), 1.6% Triton X-100, 40 mM MgCl₂, 8 mM 2,3 dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid)を加えボルテックスミキサーで攪拌後、20秒間ソニケータバスで超音波処理を行い十分に溶解させ基質溶液とした。

- 15 基質溶液を10 μ l、800 μ MのCMP-シアル酸を10 μ l、粗酵素液を10 μ l、サンプルを10 μ lを混合後、37℃で1時間インキュベーションした。サンプルとしてGM3合成酵素活性への阻害作用が報告されているシチジナーリン酸(CMP)を用いた(Biochem Biophys. Res. Commun., 193巻, 585-590頁, 1993年)。1 mlのクロロホルム/メタノール混合液(2:1)を反応液に添加し反応を終了させ、攪拌後、
20 30分間ソニケータバスで超音波処理を行った。15,000 rpm、5分間遠心操作で上清を回収し、ペレットをさらに200 μ lのクロロホルム/メタノール混合液(2:1)で洗浄し、同様の遠心操作で上清を回収した。集めた上清を窒素気流下で乾固し、50 μ lのクロロホルム/メタノール混合液(2:1)で再懸濁後、遠心分離を行い上清の20 μ lをHPTLC(メルク社製)にスポットし、クロロホルム/メタノール
25 /0.2% CaCl₂水溶液(50:45:10)の溶媒系で展開した。展開後、LAS-1000(富士フィルム社製)で蛍光強度を測定した。基質であるBODIPY-ラクトシルセラミドおよび生成物であるBODIPY-GM3の蛍光強度をそれぞれ測定し、添加したラクトシルセラミドに対する生成したGM3の割合を計算した。活性は1 mgの粗酵素液タンパク質当たり、1時間に生成したGM3の量(nmol)として算出した。

$$\begin{aligned}
 & \text{GM3合成酵素活性 (nmol/mg/hr)} \\
 & = \text{BODIPY-GM3 (AU)} / (\text{BODIPY-ラクトシルセラミド (AU)} + \text{BODIPY-GM3 (AU)}) \\
 & \quad \times 10 \text{ nmol} \times 1 / (\text{タンパク質量 (mg)} \cdot \text{反応時間 (hr)})
 \end{aligned}$$

5 AUはLAS-1000で定量した数値である。

測定した結果を表3に示す。

〔表3〕

10

CMP (mM)	GM3合成酵素活性 (nmol/mg/hr)
0	73
0.1	46
0.3	27
1	12
3	5
10	7

15

20 以上に述べたアッセイ系で、GM3合成酵素の活性およびそのCMPによる阻害が測定された。CMPに換えて試験化合物を添加することにより、GM3合成酵素阻害化合物をスクリーニングすることができる。

2) GM3合成酵素阻害剤のスクリーニング方法 (2)

25 GM3合成酵素の基質であるラクトシルセラミドのPhospholipid FlashPlate (PE社製) へのコーティングは以下に示す方法で行った。200 μ M ラクトシルセラミド含有反応緩衝液 (100 mM sodium cacodylate (pH6.5), 10 mM MgCl_2) を200 μ l/ウェルで分注した後、室温で一晩放置した。PBSで一回洗浄後、30 μ Mのラクトシルセラミド反応緩衝液を70 μ l/ウェルで分注した。

実施例4に記載の手法で調整した粗酵素液を10 μ l、CMP溶液を10 μ l、500 μ M

CMP- [^{14}C] シアル酸（アマシャム社製, 5×10^4 cpm/well）を10 μl を混合後、37°Cで3時間インキュベーションした。放射活性をトップカウント（PE社製）で測定した。

- 5 粗酵素の代わりに細胞懸濁緩衝液を用いたウェルをブランクとして扱い、サンプルウェルのcpm値からブランクウェルのcpm値を引いた値を酵素活性値とした。

CMPの無添加ウェルを酵素活性測定値を1として、これに対する相対値をそれぞれ算出した。

結果を表4に示す。

10 [表4]

15	CMP (mM)	GM3合成酵素活性 (相対値)
	0	1.00
	0.04	1.01
	0.12	0.73
	0.4	0.58
	1.2	0.32
	4	0.28

- 20 以上に述べたアッセイ系で、GM3合成酵素の活性およびそのCMPによる阻害が測定された。CMPに換えて試験化合物を添加することにより、GM3合成酵素阻害化合物をスクリーニングすることができる。

実施例5

- 25 RAW264.7株におけるshRNA発現レトロウィルスによるGM3合成酵素活性への影響

RAW264.7株（ATCCから購入；Raschke WC, et al., Cell, 15巻, 261-267頁, 1978年）を10% FBS-DMEM培地に 1×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、12ウェルプレートに1 ml/ウェルで播種した。37°C、5% CO_2 下で一晩培養後、shRNA（short hairpin RNA）用配列、SH1（配列番号：5）またはSH3（配列番号：

- 6) を発現するレトロウィルス RAW264.7 株に感染させた。一晩培養後、10% FBS-DMEM 培地に交換し、コンフルエントになるまで培養した。この細胞に対し実施例 4 に記載の方法で粗酵素液を調整し、その GM3 合成酵素活性を測定した。RAW264.7 株の酵素活性の値を 1 としてそれに対するウィルス感染細胞の値を相対値として求めた。結果を表 5 に示す。

〔表 5〕

	感染レトロウィルス	GM3 合成酵素活性 (相対値)
10	無し	1.0
	SH1	0.3
	SH3	0.5

- この結果、shRNA 発現レトロウィルス感染 RAW264.7 株において GM3 合成酵素活性が低下していることが確認された。

実施例 6

RAW264.7 株における GM3 合成酵素ノックダウンのコレステロール搬出に対する影響

- 20 GM3 合成酵素に対する shRNA を発現するレトロウィルスに感染させた RAW264.7 株を、10% FBS-DMEM 培地に $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ml となるように懸濁し、12 ウェルプレートに 1 mL/ウェルで播種した。37℃、5% CO₂ 存在下で一晩培養後、PBS で洗浄し、[³H] コレステロール標識 β VLDL (最終濃度 150 μ g トータルコレステロール/ml) を含む 1% FBS 含有 DMEM 培地を加えた後、一晩培養した。0.2% BSA/PBS で 25 回洗浄後、さらに PBS で洗浄し、0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換し、一日培養した。20 μ g/ml アポリポプロテイン A1 を含む 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に交換し、6 時間培養した。培養上清を回収し、遠心分離により細胞残渣を除いた上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。培養上清を除いた細胞に 0.1% SDS を含む 0.1N NaOH 溶液を加え、37℃ で一晩加温後、細胞溶解液の放射活性を液

体シンチレーションカウンターで測定した。培養上清および細胞溶解液の放射活性の総和に対する培養上清の放射活性の割合を算出し、コレステロール搬出活性とした。RAW264.7株の値を1としてウィルス感染細胞の値を相対値として求めた。結果を表6に示す。

(表 6)

感染レトロウィルス		コレステロール搬出活性 (相対値)
5	無し	1.0
	SH1	1.3
	SH3	1.1

- この結果、GM3合成酵素活性が低下しているshRNA発現レトロウィルス感染 RAW264.7株においてコレステロール搬出が上昇することが明らかとなった。以上
- 10 の結果から、GM3合成酵素の活性阻害または発現阻害剤が、コレステロール搬出を促進し抗動脈硬化作用につながることを示された。

産業上の利用可能性

- 本発明で用いられるGM3合成酵素は、動脈硬化により特異的に発現亢進し、
- 15 動脈硬化の診断マーカーであり、したがって、GM3合成酵素の活性を阻害する化合物またはその塩、GM3合成酵素遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、GM3合成酵素の産生を阻害する化合物またはその塩などは、例えば、動脈硬化や動脈硬化性疾患（例、脳動脈疾患（例、脳梗塞、脳出血など）；冠動脈疾患（例、心筋梗塞、狭心症などの虚血性心疾患など）；大動脈疾患（例、大動脈
- 20 瘤、大動脈解離など）；腎動脈疾患（例、腎硬化症、腎硬化症などに起因する腎不全など）；末梢動脈疾患（例、閉塞性動脈硬化症など）；など）の予防・治療剤として安全に使用することができる。

請求の範囲

1. GM3 合成酵素阻害剤を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬。
2. GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬。
- 5 3. GM3 合成酵素が、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 または 2 記載の医薬。
4. GM3 合成酵素が、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩である請求項 1 または 2 記載の医薬。
- 10 5. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。
6. 請求項 5 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
- 15 7. 動脈硬化の予防・治療用医薬である請求項 6 記載の医薬。
8. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する siRNA または shRNA。
9. 請求項 8 記載の siRNA または shRNA を含有してなる医薬。
- 20 10. 動脈硬化の予防・治療用医薬である請求項 9 記載の医薬。
11. GM3 合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の予防・治療用医薬。
12. GM3 合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の診断薬。
13. 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる動脈硬化の診断薬。
- 25 14. GM3 合成酵素に対する抗体または配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする動脈硬化

の診断方法。

15 15. 動脈硬化の診断薬の製造のためのGM3合成酵素に対する抗体または配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用。

16. 哺乳動物の血漿中のGM3量を測定することを特徴とする動脈硬化の診断方法。

17. GM3の動脈硬化の診断マーカーとしての使用。

10 18. 哺乳動物の血漿中のGM3合成酵素の量を測定することを特徴とする動脈硬化の診断方法。

19. GM3合成酵素の動脈硬化の診断マーカーとしての使用。

20 20. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法。

15 21. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

20 22. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法。

25 23. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

24. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法。

25. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の量を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法。

26. GM3合成酵素に対する抗体を用いることを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量方法。

27. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの量を測定することを特徴とする動脈硬化の予防・治療剤のスクリーニング方法。

28. GM3合成酵素を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法。

29. GM3合成酵素遺伝子の発現を阻害することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法。

30. GM3合成酵素阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法。

31. GM3合成酵素遺伝子の発現阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法。

32. 動脈硬化の予防・治療剤の製造のためのGM3合成酵素阻害剤の使用。

33. 動脈硬化の予防・治療剤の製造のためのGM3合成酵素遺伝子の発現阻害剤の使用。

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> A pharmaceutical composition for treating or preventing atherosclerosis

<130> P04-251PCT

<150> JP2004-9383

<151> 2004-01-16

<160> 6

<210> 1

<211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapience

<400> 1

```

Met Arg Arg Pro Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Leu Lys Cys Thr Leu
      5      10      15
Leu Val Phe Gly Val Trp Ile Leu Tyr Ile Leu Lys Leu Asn Tyr Thr
      20      25      30
Thr Glu Glu Cys Asp Met Lys Lys Met His Tyr Val Asp Pro Asp His
      35      40      45
Val Lys Arg Ala Gln Lys Tyr Ala Gln Gln Val Leu Gln Lys Glu Cys
      50      55      60
Arg Pro Lys Phe Ala Lys Thr Ser Met Ala Leu Phe Glu His Arg
      65      70      75
Tyr Ser Val Asp Leu Leu Pro Phe Val Gln Lys Ala Pro Lys Asp Ser
      85      90      95
Glu Ala Glu Ser Lys Tyr Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser
      100      105      110
Ser Lys Val Gln Thr Leu Leu Glu Leu Leu Pro Glu His Asp Leu Pro
      115      120      125
Glu His Leu Lys Ala Lys Thr Cys Arg Arg Cys Val Val Ile Gly Ser
      130      135      140
Gly Gly Ile Leu His Gly Leu Glu Leu Gly His Thr Leu Asn Gln Phe
      145      150      155
Asp Val Val Ile Arg Leu Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu
      165      170      175
His Val Gly Asn Lys Thr Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala
      180      185      190
Pro Leu Ser Asp Leu Glu Tyr Tyr Ser Asn Asp Leu Phe Val Ala Val
      195      200      205
Leu Phe Lys Ser Val Asp Phe Asn Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Lys
      210      215      220
Glu Thr Leu Pro Phe Trp Val Arg Leu Phe Phe Trp Lys Gln Val Ala
      225      230      235
Glu Lys Ile Pro Leu Gln Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val
      245      250      255
Ile Ile Lys Glu Thr Ala Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln
      260      265      270
Ser Arg Phe Trp Gly Arg Asp Lys Asn Val Pro Thr Ile Gly Val Ile
      275      280      285
Ala Val Val Leu Ala Thr His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly
      290      295      300
Phe Gly Tyr Asp Leu Asn Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp
      305      310      315
Ser Gln Cys Met Ala Ala Met Asn Phe Gln Thr Met His Asn Val Thr
      325      330      335
Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Val Lys
      340      345      350
Asp Leu Ser Gly Gly Ile Asp Arg Glu Phe
      355      360

```

<210> 2

<211> 1086

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 2

```

atgagaaggc ccagcttggt attaaaagac atccctcaaa glacattgct tggitttga 60
gttggaatcc ttatatacct caagtlaaa tatactacig aagaatgta calgaaaaa 120
atgcallatg tggaccctga ccatglaaag agagctcaga aatagctca gcaagcttg 180
cagaaggaat gtcgtcccaa gtlggccaag acatcaatgg cgctgttatt tggacacagg 240

```

```

tatagcglgg acttactccc ttttggcag aaggcccca aagacagtga agclgagtc 300
aaglacgalt cttcttttgg gttccggaag ttctccagta aagtcagac cttcttggaa 360
ctcttggcag agcacgacct ccttgaacac ttgaaagcca agacctgtcg gcgtgtgtg 420
gttattggaa gctggaggaa actgcacgga ttagaactgg gccacacct gaaccagttc 480
galtgttga taaggltaaa cagtcacca gttgaggat attcagaaca ttttggaaa 540
aaaactacta taaggalgac ttatccagag ggccgaccac tgtctgacct tgaatattat 600
tccaatgact tatttgttgc ttttttatt aagagtgttg attcaactg gcttcaagca 660
atggtaaaaa aggaaccct gccattctgg gtacgacct tcttttggaa gcaggltgca 720
gaaaaaatcc cactgcagcc aaaacattc aggatlttga atccagttat calcaagag 780
actgctttg acatcttca gtatccagag cctcagltca ggltctgggg ccgagalaag 840
aacgtccca caatcgggt ctttgcgtt gttttagcca cacatcttg cgaagaagtc 900
agtttggcgg gtttggata tgacctcaat caaccagaa cacttttga ctacttcgac 960
agtcaalgca tggctgtat gaacttcag accatgcata atgtgacaac ggaaaccaag 1020
ttctctttaa agctgttcaa agaggagtg gtgaaagat tcagltgagg cattgaltgt 1080
gaattt 1086

```

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 taatcggaag tggcgaata c 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 ctggcccca gaaccttgac c 21

<210> 5
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleotide Sequence for shRNA

<400> 5
 gaagaccag ctgttaatg tgtgtgtcc attaacaagc tgggtcttct tttt 54

<210> 6
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleotide Sequence for shRNA

<400> 6
 gccaatgatt ttttctttag tgtgtgtcc taacgaaca atcatggct tttt 54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 39/395, A61P9/10, 43/00, C12N15/11,
C12Q1/48, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 39/395, A61P9/10, 43/00, C12N15/11,
C12Q1/48, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-333682 A (Seikagaku Corp.), 05 December, 2000 (05.12.00), & US 2003/0087396 A1	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	JP 11-018778 A (Seikagaku Corp.), 26 January, 1999 (26.01.99), & EP 890645 A2	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	FUKUMOTO, Satoshi et al., Expression cloning of mouse cDNA of CMP-NeuAc: lactosylceramide .alpha.2,3-sialyltransferase, an enzyme that initiates the synthesis of gangliosides, Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (14), 9271 to 9276	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 April, 2005 (13.04.05)

Date of mailing of the international search report
10 May, 2005 (10.05.05),

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000733

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasutake USUKINE, "Toshitsu GB3 no Kino Kaimei ni Mukete -Seigosei Sogaizai no Katsuyo-", Nippon Yuka Gakkaishi, 1997, 46(10), 1075 to 1086	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	MELKERSON-WATSON, Lyla J. et al., Purification to apparent homogeneity by immunoaffinity chromatography and partial characterization of the GM3 ganglioside-forming enzyme, CMP-sialic acid:lactosylceramide .alpha.2, 3-sialyltransferase (SAT-1), from rat liver Golgi, Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(7), 4448-57	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000733

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14, 16-19, 28-31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14, 16 to 19 and 28 to 31 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 13, 15, 20 to 25, 27, 32 and 33 relate to a drug for preventing or treating arteriosclerosis which contains a GM3 synthase inhibitor or an agent suppressing the expression of a GM3 synthase gene and a diagnostic for arteriosclerosis which contains an antibody against GM3 synthase. On the other hand, the invention according to claim 26 relates to a method of quantifying a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, its partial peptide or its salt characterized by using an antibody against GM3 synthase. However, it cannot be recognized that the above-described method of quantifying a protein, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 13, 15, 20 to 25, 27, 32 and 33.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000733

Continuation of Box No. II-1 of continuation of first sheet (2)

of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

its partial peptide or its salt characterized by using an antibody against GM3 synthase is a method specifically applied to the production of a drug for preventing or treating arteriosclerosis which contains a GM3 synthase inhibitor or an agent suppressing the expression of a GM3 synthase gene or a diagnostic for arteriosclerosis which contains an antibody against GM3 synthase. Thus, there is no common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. Therefore, no technical relevancy can be found out between these invention groups differing from each other in the meaning within PCT Rule 13. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features and, therefore, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

<Subject of search>

Claims 1, 2, 32 and 33 relate to a drug for preventing or treating arteriosclerosis which contains, as the active ingredient, a compound defined by a desired property, i.e., "a GM3 synthase inhibitor" or "an agent suppressing the expression of a GM3 synthase gene". Although claims 1, 2, 32 and 33 involve any compounds having these properties, it is recognized that only small parts of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds having the property as "a GM3 synthase inhibitor" or "an agent suppressing the expression of a GM3 synthase gene" cannot be specified. Thus, claims 1, 2, 32 and 33 do not comply with the requirement for clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on the relationship between "inhibition of GM3 synthase" and "inhibition of the expression of a GM3 synthase gene" and "arteriosclerosis".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 48/00, 31/7088, 39/395, A61P9/10, 43/00, C12N15/11, C12Q1/48, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 48/00, 31/7088, 39/395, A61P9/10, 43/00, C12N15/11, C12Q1/48, 1/68, G01N33/15, 33/50, 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P 2000-333682 A (生化学工業株式会社), 2000.12.05 & US 2003/0087396 A1	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	J P 11-018778 A (生化学工業株式会社), 1999.01.26 & EP 890645 A2	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	FUKUMOTO, Satoshi et al., Expression cloning of mouse cDNA of CMP-NeuAc: lactosylceramide .alpha.2,3-sialyltransferase, an enzyme that initiates the synthesis of gangliosides, Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(14), 9271-9276	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

4 C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	臼杵靖剛, 糖脂質GM3の機能解明に向けてー生合成阻害剤の活用ー, 日本油化学会誌, 1997, 46(10), 1075-1086	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33
A	MELKERSON-WATSON, Lyla J. et al., Purification to apparent homogeneity by immunoaffinity chromatography and partial characterization of the GM3 ganglioside-forming enzyme, CMP-sialic acid:lactosylceramide .alpha.2, 3-sialyltransferase (SAT-1), from rat liver Golgi, Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(7), 4448-57	1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 16-19, 28-31 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 14, 16-19, 28-31 は、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項の範囲 1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33 に係る発明は、GM3 合成酵素阻害剤または GM3 合成酵素遺伝子の発現抑制剤を含有する動脈硬化の予防・治療用医薬、並びに、GM3 合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の診断薬に関するものであるのに対し、請求の範囲 26 に係る発明は、GM3 合成酵素に対する抗体を用いることを特徴とする配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量方法である。しかしながら、GM3 合成酵素に対する抗体を用いることを特徴とする上記タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量方法は、GM3 合成酵素阻害剤または GM3 合成酵素遺伝子の発現抑制剤を含有する動脈硬化の予防・治療用医薬、又は、GM3 合成酵素に対する抗体を含有してなる動脈硬化の診断薬の製造のために特に適用した方法とは認められないから、PCT 規則 13.2 の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間に PCT 規則 13 の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 1-13, 15, 20-25, 27, 32, 33

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲 1, 2, 3 2, 3 3 は、「GM3 合成酵素阻害剤」、「GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする動脈硬化の予防・治療用医薬に関するものである。そして、請求の範囲 1, 2, 3 2, 3 3 は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5 条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「GM3 合成酵素阻害剤」、「GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲 1, 2, 3 2, 3 3 は、PCT 6 条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「GM3 合成酵素の阻害」、「GM3 合成酵素遺伝子の発現阻害」と「動脈硬化」との関係について行った。